

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-167972

(43)Date of publication of application : 23.06.1998

(51)Int.Cl.

A61K 35/74

A61K 35/74

(21)Application number : 08-327673

(71)Applicant : TAKEDA SHOKUHIN KOGYO KK

(22)Date of filing : 22.11.1996

(72)Inventor : MUROZAKI SHINJI
YAMAMOTO YOSHIHIRO
IGUCHI TAKEAKI
MUROYAMA KOTARO
KIKKAI YASUNOBU

(30)Priority

Priority number : 08289333

Priority date : 11.10.1996

Priority country : JP

(54) IMMUNOACTIVATOR

(57)Abstract :

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an immunoactivator which shows potent immunoactivative effect with no side effect and can be formulated with foods to administrate by containing bacteria which belong to the genus Lactobacillus and possess T-lymphocyte co-stimulative effect and B-lymphocyte activation-repressive effect.

SOLUTION: This immunoactivator is obtained by containing bacteria, e.g. Lactobacillus plantarum L-137 strain and the like, which belong to the genus Lactobacillus and possess T-lymphocyte co-stimulative effect and B-lymphocyte activation-repressive effect or/and interleukin 12 production-facilitative effect, or its treated product. This immunoactivator possesses high safety and immunoactivative effect when it is administrated to human bodies and is useful for preventions and treatments of infections caused by viruses and bacteria and of malignant tumors.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

07.02.2003

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-167972

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月23日

(51) Int.Cl.⁶

A 6 1 K 35/74

識別記号

ABD

F I

A 6 1 K 35/74

ABDA

D

審査請求 未請求 請求項の数 3 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平8-327673

(22) 出願日 平成 8 年(1996) 11月22日

(31) 優先権主張番号 特願平8-289333

(32) 優先日 平 8 (1996) 10月11日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000238511

武田食品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 3 番 6 号

(72) 発明者 室▲崎▼ 伸二

奈良県奈良市芝辻町三丁目 6 番 27-208 号

(72) 発明者 山本 佳弘

兵庫県伊丹市荻野 8 丁目 21 番地の 2 ハイ
ツマインド 203 号

(72) 発明者 井口 武明

兵庫県神戸市須磨区離宮前町 1 丁目 5-25

(74) 代理人 弁理士 谷 良隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫賦活剤

(57) 【要約】

【課題】現在用いられている免疫賦活剤は、免疫担当細胞を非特異的に活性化することにより微生物感染、腫瘍等に対する生体の防御機構を高めるものであるが、有効性において必ずしも満足しうるものではない。またこれらの免疫賦活剤は一般に作用の特異性が低いため、たとえばBリンパ球の活性化による全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患のような副作用が懸念される。

【解決手段】ラクトバチルス (Lactobacillus) 属に属する菌の中に、Tリンパ球共刺激作用とBリンパ球活性化抑制作用または/およびインターロイキン 1 2 の産生を選択的に促進する作用を有するものが存在することを見出した。この菌の菌体またはその処理物を医薬として投与または食品として摂取すると、副作用を伴うことなく免疫を賦活させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属に属し、Tリンパ球共刺激作用とBリンパ球活性化抑制作用または／およびインターロイキン12産生促進作用を有する菌またはその処理物を含んでなる免疫賦活剤。

【請求項2】菌がラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）である請求項1記載の免疫賦活剤。

【請求項3】菌がラクトバチルス・プランタラムL-137株である請求項1記載の免疫賦活剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、乳酸菌に属するラクトバチルス（*Lactobacillus*）の菌体またはその処理物を含んでなる免疫賦活剤に関する。

【0002】

【従来の技術】生体内の免疫系は、細菌、酵母、カビ、ウイルスなどの微生物による感染や、腫瘍に対する防御に重要な役割を果たしており、その防御機構の中心はTリンパ球である。Tリンパ球はこれらの微生物や腫瘍を、抗原受容体を介して認識することにより刺激を受け、抗原特異的に活性化され、これらの異物を排除する能力を高める。常に微生物に曝され、また細胞が変異している生体内では、こうしたTリンパ球は抗原受容体を介して常に活性化される一方で、抗原受容体以外の経路でも抗原非特異的に活性化されている。抗原特異的および抗原非特異的のいずれの活性化においても、他からの刺激、すなわち共刺激が加わるとTリンパ球の活性化はさらに促進される。現在用いられている免疫賦活剤は、免疫担当細胞を非特異的に活性化することにより、微生物感染、腫瘍に対する生体の防御機構を高めるものであるが、有効性において満足しうるものは少なく、また、これらの免疫賦活剤は、一般に作用の特異性が低いため、たとえばBリンパ球の活性化による全身性エリテマトーデス、慢性関節リュウマチ等の自己免疫疾患のような副作用が懸念される。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、自体免疫賦活作用を有し、さらに他の免疫賦活物質と併用することにより、より強い免疫賦活作用を示し、実質的に副作用がなくたとえば食品に配合して投与することもできる免疫賦活剤を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記課題を解決するため免疫賦活剤に関する研究を重ねたところ、乳酸菌の1種であるラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）L-137株の菌体がTリンパ球共刺激作用を示すことを見いだした。また該菌体が抗原受容体を介する刺激により活性化されたTリンパ球の活性をさらに上昇させ、また抗原受容体以外の経路に

より抗原非特異的に活性化されたTリンパ球の活性をも上昇させることを突き止めた。これらのTリンパ球の活性化に伴い、Tリンパ球のインターフェロン- γ の産生が増強される一方、Bリンパ球への抗原受容体を介する刺激および抗原受容体以外の経路による活性化は抑制される事実も判明した。これとは別に該菌体がマクロファージのインターロイキン12の産生を選択的に促進する作用を有していることも判明した。すなわち、ラクトバチルス・プランタラムL-137菌体は、抗原受容体を介するTリンパ球の活性化を上昇させることにより、生体内で常時起こっている微生物および腫瘍細胞に対する排除反応を高め、特にインターフェロン- γ の産生を増強することから、ウイルスや腫瘍に対する防御能を高める。しかし、単独ではリンパ球をほとんど活性化しないことから、生体にとって好ましくない免疫応答を誘導せず、また、Bリンパ球の抗原受容体を介する活性化や抗原非特異的な活性化を抑制することにより、免疫賦活に伴い予測されるBリンパ球のポリクローナルな活性化により誘導される自己免疫疾患等は増悪させない。またラクトバチルス・プランタラムL-137菌体は、腫瘍細胞傷害性を有するナチュラルキラー細胞を活性化するサイトカインであるインターロイキン12のマクロファージからの産生を高める結果、腫瘍に対する防御能を特に高めるとともに、後天性免疫不全症候群（AIDS）の発症予防にも有用である。しかし腫瘍壊死因子 α の産生は軽度にしかならないため、通常のマクロファージの活性化剤により上昇する腫瘍壊死因子 α により引き起こされる、発熱、体重減少、エンドトキシンショックへの感受性増大などの副作用を誘導しない。このように、ラクトバチルス・プランタラムL-137菌体は副作用がなく常用に適した免疫賦活剤であり、また該菌体は抗原非特異的なTリンパ球の活性化を上昇させたり、またマクロファージによるインターロイキン12の産生を促進するので他の免疫賦活剤との併用も有効であることを見いだし本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、（1）ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属に属し、Tリンパ球共刺激作用とBリンパ球活性化抑制作用または／およびインターロイキン12産生促進作用を有する菌またはその処理物を含んでなる免疫賦活剤、

（2）菌がラクトバチルス・プランタラム（*Lactobacillus plantarum*）である前記（1）記載の免疫賦活剤、および（3）菌がラクトバチルス・プランタラムL-137株である前記（1）記載の免疫賦活剤、である。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明に用いられる菌は、ラクトバチルス属に属し、Tリンパ球共刺激作用およびBリンパ球活性化抑制作用または／およびマクロファージのインターロイキン12産生を促進する作用を有するものであればどのような菌でもよい。菌のTリンパ球共刺激作

用並びにBリンパ球活性抑制作用は、たとえばマウス脾臓細胞をフィトヘマグルチニン等のTリンパ球増殖刺激物質またはリボポリサッカライドなどのBリンパ球増殖刺激物質を含む培地で培養するときラクトバチルス属に属する菌を添加し、一定期間培養して培地中の細胞のミトコンドリア代謝活性を臭化3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムを用いて測定する比色定量法により容易に判定することができる。菌のマクロファージのインターロイキン12産生促進作用は、たとえばマウス腹腔マクロファージを組織培養プレートで培養し、ラクトバチルス属に属する菌を添加し一定期間培養して培地中のインターロイキン12濃度をエンザイムイムノアッセイで測定することにより容易に判定することができる。本発明の免疫賦活剤との共刺激作用によりTリンパ球の活性を上昇させる物質、すなわち本発明の免疫賦活剤と併用しうる免疫賦活剤としては、たとえばインターロイキン2などのサイトカイン類、フィトヘマグルチニンなどのレクチン類、抗CD3抗体などの抗Tリンパ球表面抗原抗体などが挙げられる。

【0006】本発明に用いられるラクトバチルス属に属する菌の代表的なものとしてラクトバチルス・プランタラムL-137を挙げることができるが、この菌は工業技術院生命工学工業技術研究所に平成7年11月30日に受託番号FERM P-15317、微工研 菌寄第15317号として寄託されている。ラクトバチルス・プランタラムL-137は、フィリピンの発酵食品ブロングイスダ(Burong isda)から分離された微生物であり、特定の糖類(グルコン酸、アラビノース、ラムノースおよびスターチ)に対する資化性が、ラクトバチルス・プランタラム(Lactobacillus plantarum) JCM 1149基準株およびラクトバチルス・プランタラムL-051(微工研菌寄第11912号)と相違する。すなわち、下記の糖類に対して次のような資化性を示す。

グルコン酸 -
アラビノース -
ラムノース -
スターチ +

さらに、ラクトバチルス・プランタラムL-137と前記ラクトバチルス・プランタラムJCM 1149基準株およびラクトバチルス・プランタラムL-051株との菌学的性質を対比すると、【表1】の通りである。

【0007】

【表1】

	本発明の微生物	JCM 1149基準株及びL-051株
(1) 形態	桿菌	桿菌
(2) 胞子	形成せず	形成せず
(3) グラム染色	陽性	陽性
(4) カタラーゼ反応	陰性	陰性
(5) ガスの発生	陰性	陰性
(6) 生成乳酸	D/L型	D/L型
(7) 15℃での生育	+	+
(8) 45℃での生育	-	-
糖の資化性		
(9) グルコース	+	+
(10) フラクトース	+	+
(11) ガラクトース	+	+
(12) マンノース	+	+
(13) セロビオース	+	+
(14) ラクトース	+	+
(15) マルトース	+	+
(16) サッカロース	+	+
(17) ラフィノース	+	+
(18) サリシン	+	+
(19)トレハロース	+	+
(20) マンニトール	+	+
(21) グルクロン酸Na (グルコン酸)	-	+
(22) アラビノース	-	+
(23) リボース	+	+
(24) キシロース	-	-
(25) ラムノース	-	+
(26) スターチ	+	-
(27) GC%	45.2	45.1

【0008】以上の菌学的性質、および細胞壁のペプチドグリカンタイプがメゾージアミノピメル酸(meso-diaminopimelic acid)であること、さらに、L-137菌株と22タイプの乳酸菌基準株との間でのDNA-DNA交雑実験法を行ったところ、L-137菌株はラクトバチルス・プランタラムにのみ強くDNAの相同性が得られたことにより、本発明に用いられる微生物はラクトバチルス・プランタラムと同定された。本発明の微生物については、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.73, No.3, 193-197(1992)及び Vol. 80, No.2, 124-130(1995)にも報告されている。本発明の免疫賦活剤は、ラクトバチルス属に属し、Tリンパ球共刺激作用とBリンパ球活性化抑制作用を有する菌を天然培地、合成培地、半合成培地などの培地に培養することにより得ることができる。培地としては、窒素源および炭素源を含有するものが用いられる。窒素源としてはたとえば、肉エキス、ペプトン、グルテン、カゼイン、酵母エキス、アミノ酸等であり、炭素源としては、たとえば、グルコース、キシロース、フラクトース、イノシトール、水アメ、麴汁、澱粉、バカス、フスマ、糖蜜、グリセリン等が用いられる。このほか、無機質として、たとえば硫酸

アンモニウム、リン酸カリウム、塩化マグネシウム、食塩、鉄、マンガン、モリブデン更に各種ビタミン類その他を添加することができる。

【0009】培養温度は25～40℃、好ましくは27～35℃であり、培養時間は12～48時間程度であり、通気振盪してもよい。培地のpHは3～6、好ましくは4～6である。培養終了後菌体を採取し蒸留水を加え、遠心分離などの手段により上清を除き、必要によりその操作を繰り返し、遠心分離や濾過等により菌体を採取する。採取された菌体は生菌のまま、またはたとえば過熱、紫外線照射、ホルマリン処理などにより不活性化して投与に適した剤型にすることもできる。分離された生菌体、死菌体はさらに摩砕や破砕処理をし、得られた処理物を必要により加熱滅菌、無菌濾過し、濾液を凍結乾燥して製品とすることもできる。菌体の処理物にはたとえば、上記摩砕物、破砕物、それらからの抽出液、凍結乾燥品が含まれる。また、本発明に用いられる乳酸菌の一種、ラクトバチルス・プランタラム L-137株は、元々発酵食品であるブロングイスダから分離されたものであり、食品、たとえば果菜類、穀類から選択された少なくとも1種または、果菜類や穀類を発酵可能な形態に処理したもの、たとえば切断物、粉碎物、摩砕物、搾汁、搾汁濃縮物を本発明において用いられる菌により発酵させた菌を含む発酵物をそのまま用いることができ、これも本発明の好ましい態様の1つである。前記の発酵法を利用すると、野菜汁に対して、フレッシュなニンジン汁などを得るためのフレッシュスクイーズ法などの特別な前処理を施す必要がなく、また乳成分を添加する必要がなく、乳酸菌の果菜類などの処理物（野菜汁など）に対する高い発酵能により、乳酸菌を多量に含み味覚的にも極めて優れた発酵物を得ることができる。また、被発酵処理物が臭いのきつい果菜類や穀類を含んでいても、野菜類などの特有の不快臭や加熱による不快臭を顕著に低減できるとともに、風味を改善でき、極めて容易に食することができる発酵食品が得られる。しかも、サイレージと異なり発酵食品から分離された食習慣のある乳酸菌であるため、本発明の微生物は安全性も高い。

【0010】上述の乳酸菌発酵物は、果菜類及び穀類から選択された少なくとも一種の処理物を前記乳酸菌により発酵させることにより得られる。前記果菜類には、種々の可食性植物、例えば、野菜類（例えば、ニンジン、トマト、ホウレン草、ばせり、シソ葉、大葉、芽キャベツ、小松菜、カボチャ、大根葉、ピーマン、ケール、カンショ葉、春菊、セリなどの緑黄色野菜類、セロリ、キャベツ、アスパラガス、キュウリ、スイカなどの他の野菜類）、リンゴ、バナナ、パパイヤ、アボガド、ミカン、グレープフルーツ、レモン、パイナップル、ピーチ、柿、イチゴ、ブドウ、メロン、ココナッツなどの果物類などが含まれる。穀類には、米、トウモロコシ、大

豆、小麦、ライ麦などが含まれる。これらの果菜類などは単独で又は二種以上組み合わせて使用でき、必要に応じて、これらの果菜類などは、ジャガイモ、サツマイモなどのイモデンプン類と併用してもよい。好ましい果菜類には、ニンジンなどの緑黄色野菜類、バナナなどの果物類、米などの穀類などが含まれる。また、処理物としては、切断物、粉碎物、摩砕物、搾汁、搾汁濃縮物などが単独又は二種以上組み合わせて使用できる。好ましい処理物には、野菜汁、果汁などの搾汁や搾汁濃縮物などの搾汁類が含まれる。この搾汁類において、ニンジンを用いる場合、ニンジン汁の濃度はBrix2～30程度の範囲から選択できる。また、50重量%以上のニンジン処理物を含む処理物は、発酵飲料などの風味を改善する上で有用である。

【0011】前記果菜類などの処理物は、通常、ブランチング処理及び/又は殺菌処理に供された後、前記乳酸菌による発酵に供される。ブランチング処理は、前記果菜類などやその処理物、特に果菜類やその切断物を加熱処理し、酵素活性を失活させることにより行うことができ、ブランチング処理の後、遠心分離やフィルタープレスなどの方法で搾汁しジュースを得る場合が多い。また、殺菌処理は、ブランチング処理された前記果菜類などやその処理物、特に搾汁類について行う場合が多い。なお、ブランチング処理および殺菌処理は、風味を損なわない範囲で選択でき、ブランチング処理は、慣用の方法、例えば、必要に応じてオートクレーブを用い、70～100℃で短時間処理することにより行うことができる。殺菌処理は、慣用の方法、例えば、70～125℃程度の温度又は高温短時間で加熱殺菌する方法、紫外線などの光線を照射する方法などが採用できる。前記微生物による発酵は、前記乳酸菌を搾汁類などの処理物に直接接種して行ってもよいが、通常、適当な培地や前記処理物を用いて馴化培養した前記乳酸菌をスターターとして搾汁類などの処理物に接種して行う場合が多い。発酵は、慣用の方法、例えば、処理物に対して0.5～3重量%程度のスターターを接種し、25～40℃（例えば、25～38℃）、好ましくは27～38℃（例えば、27～35℃）程度で行うことができる。発酵時間は、果菜類などの処理物の種類などに応じて、例えば、数時間～数日間程度の範囲から選択できる。本発明の好ましい態様には、ニンジンなどの緑黄色野菜、果物及び穀類のうちの少なくとも一種の処理物（特に野菜および果物のうち少なくとも一種から得られた搾汁類）を前記乳酸菌で発酵させ、乳酸菌発酵飲料（緑黄色野菜ジュース、果物ジュースなど）やその加工品（緑黄色野菜ゼリー、スプレットなど）として得る方法が含まれる。

【0012】なお、発酵に際しては、必要に応じて、他の微生物、例えば、乳酸菌（ラクトバチルス・プランタラム、ラクトバチルス・カゼイ、ラクトバチルス・ラムノサスなど）やエンテロコッカス属微生物（エンテロコ

ッカス・フェカリスなど)、酵母などを併用してもよい。さらに、必要に応じて、前記処理物に、種々の添加剤、例えば、ビタミン、アミノ酸、ミネラル、植物繊維、糖類、蜂蜜などの甘味料、香料、牛乳、脱脂粉乳などの乳成分、果汁などを添加して発酵させてもよく、得られた乳酸菌発酵物に前記添加剤を添加してもよい。このようにして、果菜類などの処理物を前記乳酸菌により発酵させると、得られる乳酸菌発酵物の風味を改善できる。この方法により得られた乳酸菌発酵物は、被発酵処理物が臭いのきつい果菜類や穀類を含んでいても、不快臭を顕著に低減できるとともに、加熱による不快臭も抑制できる。また、乳酸菌の発酵により適度な酸味(例えば、pH4~5程度)を呈するとともに、官能的に優れた風味を有しており、極めて容易に食することができる。

【0013】本発明の免疫賦活剤は、自体公知の食品あるいは、食品成分、医薬担体または賦形剤と自体公知の方法で合して、免疫力を高める食品や医薬剤としても利用可能である。用いる食品あるいは、食品成分、医薬担体または賦形剤は特に限定するものではなく、当該免疫賦活剤の具体的用途に応じて当業者が適宜選択できる。また免疫賦活剤の形態も特に限定する物ではなく、具体的用途に応じて種々の固体や液体の形態とすることができる。本発明の免疫賦活剤は、医薬として用いる場合、経口投与あるいは、非経口投与が考えられるが、一般的に請求項1に記載の有効成分のいずれか、あるいは組み合わせで用いることが可能であり、その投与量は、投与形態にもよるが、経口投与の場合有効成分として成人1日当たり40mg~40gであり、静注の場合は0.1mg~1gである。本発明の免疫賦活剤を食品として用いる場合、調味料、畜肉加工品、水産加工品、農産加工品、スナック、調味食品、調味済食品、デザート類、乳油製品、菓子、スナック菓子等の形態で提供することも可能である。本発明の免疫賦活剤は、たとえば、ウイルス、バクテリア等の微生物による感染症や各種悪性腫瘍などの予防・治療に有効である。

【0014】

【実施例】以下に実施例および試験例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれらによって限定されるものではない。

実施例1

ラクトバチルス・ブランタラムL-137乾燥菌体の製造方法

乳酸菌培養培地であるGYP培地のグルコースの代わりにスターチを加えた培地200mlにラクトバチルス・ブランタラムL-137をスターターとして1重量%接種し、32℃で24時間前培養を行った。その後、6LのGYP培地にその前培養した培養液をスターターとして1重量%接種し、32℃にて24時間静地培養した。培養後、5000rpmで35分間遠心分離した。そし

て、上清を除き、菌体を集めた。さらに、集めた菌体ペーストを生理食塩水に良く分散し、5000rpmで35分遠心分離したのち、上清を除き菌体を集めた。これを3回繰り返したのち、蒸留水に分散した。そして70℃で10分間殺菌した。これを凍結乾燥し、乾燥菌体を7.07g得た。

【0015】実施例2

4倍濃縮ニンジン汁のラクトバチルス・ブランタラムL-137発酵物の製造方法

10 L-137乾燥菌体の作成方法と同様の方法で6リットルのGYP培地で32℃、24時間培養したのち生理食塩水中に分散、遠心分離することにより集めた菌体ペーストを4倍濃縮ニンジン汁(人参1/8濃縮搾汁 宮崎農協製を蒸留水ににより希釈したもの)300mlに添加し、32℃で24時間培養した。そして70℃で10分間殺菌した。こうして得られたニンジン発酵液を適量の蒸留水で希釈し、凍結乾燥した。凍結乾燥物として約77.4gを得た。

【0016】試験例1

20 本試験例では、実施例1で得たラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体を用いて、マウス脾臓リンパ球の増殖反応に対するラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体のTリンパ球共刺激効果およびBリンパ球抑制効果を検証した。マウス(B10. A、雌、8週令)から無菌的に脾臓を摘出し、RPMI 1640培地中で脾臓を押し潰し、#200メッシュに通し脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球計測装置により測定した後、細胞数を $5 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度にRPMI 1640培地で調製し、96穴組織培養プレートに1穴あたり100 μl を播種した。Bリンパ球増殖刺激物質のリボポリサッカロイド(Difco社製)を200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度でRPMI 1640培地に溶解した液、Bリンパ球増殖刺激物質の抗マウスイムノグロブリンM(Cappel社製)を200 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度でRPMI 1640培地に溶解した液、Tリンパ球増殖刺激物質のフィトヘマグルチニン(Difco社製)をRPMI 1640培地で400倍希釈した液、およびRPMI 1640培地を、それぞれ1穴あたり50 μl 播種した脾臓細胞浮遊液に加えて、Bリンパ球刺激群(1)、Bリンパ球刺激群(2)、Tリンパ球刺激群(1)、無刺激群とした。Tリンパ球刺激群(2)として、細胞播種前にTリンパ球増殖刺激物質の抗マウスCD3抗体(Cedarlane社製)を10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度でホウ酸緩衝液に溶解した液を1穴あたり100 μl 加え、37℃で3時間放置し、抗マウスCD3抗体を各穴に付着させ、3時間後にRPMI 1640培地で洗浄後、RPMI 1640培地を1穴あたり50 μl 加えた穴に細胞を播種した。これらの5群にRPMI 1640培地(対照)あるいはラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体を50 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、12.5 $\mu\text{g} / \text{ml}$ および3.13 μ

g/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液をそれぞれ1穴当たり50 μ l加え、37℃の5%炭酸ガス培養器内で2日間培養し、培養後代謝活性を調べた。細胞代謝活性は、培養の終わる3時間前に臭化3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2-Hテトラゾリウムを5mg/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液を1穴当たり10 μ *

*1加え、培養終了時に20%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を1穴当たり50 μ l加え、37℃で1日放置後、マイクロプレートリーダーで培養液の吸光度550nmを測定することにより細胞代謝活性を求めた。〔表2〕にその結果を示す。
〔0.017〕
〔表2〕

	細胞代謝活性(吸光度550nm)			
	対 照	ラクトバチルス・ブランタラムL137菌体		
		0.78 *	3.13 *	12.5 *
無刺激群	0.126	0.143	0.143	0.139
Tリンパ球刺激群(1)	0.147	0.205	0.225	0.213
Tリンパ球刺激群(2)	0.487	0.569	0.571	0.556
Bリンパ球刺激群(1)	0.404	0.343	0.340	0.320
Bリンパ球刺激群(2)	0.334	0.246	0.238	0.244

*数値は培養液中のラクトバチルス・ブランタラムL137菌体の濃度(ng/ml)を示す。

〔表2〕から明らかなごとく、ラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体は、脾臓細胞が刺激を受けていない無刺激群では、わずかに細胞代謝活性を上昇させたにすぎなかったが、抗原受容体を介するTリンパ球刺激群(2)および抗原受容体以外の経路のTリンパ球刺激群(1)では顕著に細胞代謝活性を上昇させ、ラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体のTリンパ球共刺激効果が認められた。一方、ラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体は、抗原受容体を介するBリンパ球刺激群(2)および抗原受容体以外の経路のBリンパ球刺激群(1)では細胞代謝活性の上昇を抑制する作用が認められた。

〔0018〕試験例2

本試験例では、実施例1で得たラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体を用いて、マウス脾臓リンパ球のインターフェロン- γ 産生反応に対するラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体の増強効果を検証した。マウス(B10. A、雌、7週齢)から無菌的に脾臓を摘出し、RPMI 1640培地中で脾臓を押し潰し、#200メッシュに通し脾臓細胞浮遊液を得た。脾臓細胞浮遊液の細胞数を自動血球計測装置で測定した後、細胞数を5 $\times 10^6$ /mlの濃度にRPMI 1640培地で調製し、96穴組織培養プレートに1穴当たり100 μ lを播種した。Tリンパ球増殖刺激物質のフィトヘマグチニン(Difco社製)をRPMI 1640培地で400倍希釈した液を1穴当たり50 μ l播種した脾臓細胞浮遊液に加えた。これにRPMI 1640培地(対照)あるいはラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体

を200 μ g/mlおよび100 μ g/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液をそれぞれ1穴当たり50 μ l加え、37℃の5%炭酸ガス培養器内で3日間培養し、培養後の培養上清のインターフェロン- γ をエンザイムイムノアッセイで測定した。エンザイムイムノアッセイは、ハムスター抗マウスインターフェロン- γ 抗体(Genzyme社製)をホウ酸緩衝液で3 μ g/mlに調製した溶液を、96穴組織培養プレート1穴当たり100 μ l加え、5℃で3日間放置しハムスター抗マウスインターフェロン- γ 抗体を各穴に付着させたプレートを用いて行った。培養上清を1穴当たり50 μ l加え室温で90分間放置し、培養上清のインターフェロン- γ をプレートに付着したハムスター抗マウスインターフェロン- γ 抗体と結合させた。洗浄後ラット抗マウスインターフェロン- γ 抗体を加え、プレートに結合させたインターフェロン- γ に結合させた。洗浄後ペルオキシダーゼで標識した抗ラットIgG抗体を加え、プレートに結合させたラット抗マウスインターフェロン- γ 抗体に結合させた。洗浄後、過酸化水素0.006%とオルトフェニレンジアミン0.1%を含有するリン酸緩衝液を1穴当たり100 μ l加え、室温で20分間反応させ、反応を1.5N硫酸で停止し、マイクロプレートリーダーで吸光度492nmを測定し、リコンビナントマウスインターフェロン- γ で作成した標識曲線から、培養上清中のインターフェロン- γ の濃度を求めた。〔表3〕にその結果を示す。

〔0019〕

〔表3〕

	インターフェロン- γ (ng/ml)
対 照	0.13
ラクトバチルス・ブランタラムL137菌体 25 μ g/ml	0.85
50 μ g/ml	0.88

〔表3〕から明らかなごとくラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体はフィトヘマグルチニンにより誘導されるインターフェロン- γ の産生を大幅に上昇させた。

【0020】試験例3

本試験例では、実施例1で得たラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体を用いて、マウス腹腔マクロファージのインターロイキン12産生性に対するラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体の促進効果を検証した。マウス(C57BL/6、雌、15週齢)の腹腔に無菌的にRPMI 1640培地を注入し、腹部を良く揉んだ後、注入したRPMI 1640培地を回収し腹腔細胞浮遊液を得た。腹腔細胞浮遊液の細胞数とそれに含まれるマクロファージの割合を自動血球計測装置で測定した後、マクロファージとして 1×10^6 /mlの細胞数にRPMI 1640培地で調製し、96穴組織培養プレートに1穴当たり100 μ lを播種した。37℃の5%炭酸ガス培養器内に2時間放置し、腹腔マクロファージを各穴に付着させ、2時間後にRPMI 1640培地で洗浄後、RPMI 1640培地を1穴当たり100 μ l加えた。これにRPMI 1640培地(対照)あるいはマクロファージ活性化物質のリボポリサッカライド(Difco社製)を0.2 μ g/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液、あるいはラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体を0.2 μ g/mlの濃度でRPMI 1640培地に溶解した液をそれぞれ1穴当たり100 μ l加え、37℃の5%炭酸ガス培養器内で15時間培養し、培養後の培養上清のインターロイキン12と腫瘍壊死因子 α をエンザイムイムノアッセイで測定した。エンザイムイムノアッセイは、ラット抗マウスインターロイキン12 IgG2a抗体(Gen*

* zyme社製)あるいはハムスター抗マウス腫瘍壊死因子 α & β 抗体(Genzyme社製)をホウ酸緩衝液で6 μ g/mlに調製した溶液を、96穴組織培養プレート1穴当たり100 μ l加え37℃で1日間放置し、ラット抗マウスインターロイキン12 IgG2a抗体あるいはハムスター抗マウス腫瘍壊死因子 α & β 抗体を各穴に付着させたプレートを用いて行った。培養上清を1穴当たり50 μ l加え室温で90分間放置し、培養上清のインターロイキン12あるいは腫瘍壊死因子 α をプレートに付着したラット抗マウスインターロイキン12 IgG2a抗体あるいはハムスター抗マウス腫瘍壊死因子 α & β 抗体と結合させた。洗浄後ラット抗マウスインターロイキン12 IgG1抗体(Genzyme社製)あるいはラビット抗マウス腫瘍壊死因子 α 抗体(Genzyme社製)を加え、プレートに結合させたインターロイキン12あるいは腫瘍壊死因子 α に結合させた。洗浄後ペルオキシダーゼで標識した抗ラットIgG1抗体あるいは抗ラビットIgG抗体を加え、プレートに結合させたラット抗マウスインターロイキン12 IgG1抗体あるいはラビット抗マウス腫瘍壊死因子 α 抗体に結合させた。洗浄後、過酸化水素0.006%とオルトフェニレンジアミン0.1%を含有するリン酸緩衝液を1穴当たり100 μ l加え、室温で20分間反応させ、反応を1.5N硫酸で停止し、マイクロプレートリーダーで吸光度492nmを測定し、リコンビナントマウスインターロイキン12あるいは腫瘍壊死因子 α で作成した標準曲線から、培養上清中のインターロイキン12あるいは腫瘍壊死因子 α の濃度を求めた。〔表4〕にその結果を示す。

【0021】

〔表4〕

	インターロイキン12 (ng/ml)	腫瘍壊死因子 α (ng/ml)
対照	0.71	0.27
リボポリサッカライド	1.13	3.19
ラクトバチルス・ ブランタラムL-137菌体	4.26	1.05

〔表4〕から明らかなごとくラクトバチルス・ブランタラムL-137菌体は、マクロファージからのインターロイキン12の産生を大幅に上昇させたが、腫瘍壊死因子 α の産生は軽度にしかならなかった。強力なマクロファージ活性化剤であるリボポリサッカライドのサイトカイン産生促進作用と比較すると、ラクトバチルス・

ブランタラムL-137菌体が選択的にマクロファージのインターロイキン12の産生を上昇させることが明らかとなった。

【0022】

【発明の効果】本発明の免疫賦活剤は、有効成分の生産性が容易で且つ高く、また得られた免疫賦活剤は人体に

投与した場合安全性が高く且つ免疫賦活効果も高く単独 *ヤ等による感染症、悪性腫瘍等の予防・治療に用いること
または他の免疫賦活剤と併用して、ウイルス、バクテリア * とができる。

フロントページの続き

(72)発明者 室山 幸太郎
兵庫県伊丹市鑄物師2丁目69番地 メゾ
ン・ド・オーク303号

(72)発明者 吉開 泰信
愛知県名古屋市千種区園山町1丁目9-2